

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO CAMPUS BAIXADA SANTISTA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DO MAR

ENGENHARIA AMBIENTAL

KELLY RODRIGUES GONÇALVES

Santos, 2018

Análise do picoplâncton antes e após introdução
acidental de dicloroisocianurato de sódio dihidratado no
estuário de Santos, São Paulo.

KELLY RODRIGUES GONÇALVES

Santos 2018

Análise do picoplâncton antes e após introdução acidental de dicloroisocianurato de sódio dihidratado no estuário de Santos, São Paulo.

Trabalho de Conclusão de Curso do
Bacharelado em Engenharia Ambiental da
Universidade Federal de São Paulo.

Área de Concentração: Ecologia
de bactérias, biodiversidade marinha e
bioinformática

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Bueno
Gregoracci

Santos, 2018.

Kelly Rodrigues Gonçalves

Análise do picoplâncton antes e após introdução acidental de dicloroisocianurato de sódio dihidratado no estuário de Santos, São Paulo.

Trabalho de Conclusão de Curso do
Bacharelado em Engenharia Ambiental da
Universidade Federal de São Paulo.

Área de Concentração: Ecologia
de bactérias, biodiversidade marinha e
bioinformática

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Bueno
Gregoracci

BANCA EXAMINADORA

Santos, ____ de ____, 201__

AGRADECIMENTOS

O principal agradecimento deste trabalho vai ao meu orientador Greg, que depois de anos tomo liberdade para chamá-lo assim não por falta de amizade ou qualquer outro motivo, mas por todo respeito ao conhecimento que possui e forma com que se dedica a transmiti-lo, que me faz lembrá-lo em primeira instância como O professor doutor.

A trajetória começou logo no primeiro ano de faculdade, onde resolvi que ia me aventurar em algo que sabia que era complexo mas não tinha dimensão de quanto. Os anos se passaram e vitórias aconteceram: (1) aprovação como monitora de biodiversidade I, (2) aprovação do projeto FAPESP e (3) minha bolsa CNPQ. Estávamos de uma forma ou de outra juntos, sempre compartilhando o que era possível e cabível ao projeto com empolgação e principalmente questionando a tudo, e nunca, nunca, existindo uma palavra de desmotivação ou negação, mesmo para as ideias mais malucas que eu aparecia.

Para mim, ser professor é isso, é trazer o aporte do conhecimento e mostrar que tudo, ou quase tudo, é possível mas que é preciso estudo e este não depende de ninguém. Afinal, seu conselho sempre foi “é preciso sentar e estudar”, acompanhado de “acabei fazendo isso sozinho, não era tão difícil”. Você se tornou um grande exemplo para mim, de como é possível correr atrás do que se quer, ser ético até mesmo nos mínimos detalhes e ser realmente comprometido com a educação.

Aproveito para agradecer a FAPESP pelo financiamento do projeto e também ao CNPQ pela oportunidade de desenvolver o projeto. À minha família pelo aporte, a família Giglio por fazer parte de uma etapa importante para mim, e ao meu amigo e parceiro, Gustavo Shintate.

RESUMO

A Terra desde a origem da vida é habitada por micro-organismos. Estes apresentam formas variadas e estão adaptados a diversos ambientes, compreendendo a maior parte da biomassa oceânica. Em uma escala que varia de 0,22 μm até 2 μm encontramos bactérias, arqueias, vírus e alguns eucariotos, responsáveis pela produção primária, participação em ciclos biogeoquímicos, ciclagem de matéria e transferência de energia e outros, contribuindo ativamente na manutenção da vida no planeta. Com a queda nos preços de equipamentos para sequenciamento em larga escala, análises ambientais completas e complexas podem ser realizadas a partir da metagenômica. Em metodologia denominada *shotgun* são gerados diversos fragmentos de DNA a partir de amostras ambientais, estes são analisados através de bioinformática permitindo inferências taxonômicas e funcionais. Com este estudo pretende-se avaliar a região do estuário de Santos antes e após a introdução acidental de dicloroisocianurato de sódio dihidratado reconhecendo e estabelecendo dados que permitam futuramente o controle ecológico/ambiental e da região que está em constante mudança e exposta a impactos ambientais.

Palavras-chave: diversidade bacteriana. shotgun. metagenômica. Estuários de Santos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Síntese de técnicas de metagenômica (Rosso & Eguiarte, 2008).	5
Figura 2. Fragmento de ofício resposta da CETESB sobre o acidente da LocalFrio. (Cetesb, 2061).	7
Figura 3. Região de coleta. Estuário de Santos, São Paulo, Brasil. (fonte: https://www.google.com.br/maps/@23.9048713,46.3341222,12z).	9
Figura 4. Equipamento para filtração tangencial. Descrição dos equipamentos: 1) Bomba peristáltica; 2) Cartucho de filtração tangencial; 3) Mangueira para entrada de água; 4) Mangueira para saída de água; 5) Mangueira para água filtrada; 6) Isopor para suporte; 7) Fita adesiva; 8) braçadeiras para conexões (orings e conexão funil estão presos a elas); 9) TEE; 10) Manômetro.	10
Figura 5. Abundância de Espécies amostras STS 1 e 2.	12
Figura 6. Imagens dos cálculos realizados para Shannon H e Neff.	13
Figura 7. Abundância funcional amostras STS 1 e 2.	13
Figura 8. Resultados das análises físico-químicas e químicas.	14
Figura 9. Análise por PCA de todas amostras do projeto FAPESP nº 13/21745-4	15
Figura 10. Distribuição procariótica dos oceanos e gráfico de Classe e Gênero das amostras de STS 1 e 2	16
Figura 11. fragmento do Anexo 1 da análise do FAPROFAX.	18

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
A microbiologia e meio ambiente	1
Ecologia de micro-organismos	2
Avanços tecnológicos na área de metagenômica por shotgun e ecologia de vírus	3
O Porto de Santos	5
Caso da LocalFrio: dicloroisocianurato de sódio dihidratado	6
OBJETIVO	7
Objetivos específicos	7
MATERIAIS E MÉTODOS	8
Local de estudo	8
Amostragem do material	9
Procedimento imediato do material amostrado	9
Citometria de fluxo	10
Análises de DNA	10
Sequenciamento de alta performance	11
Tratamento do sequenciamento	11
RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	11
DISCUSSÃO	15
Visão geral taxonômica	15
Análises bacterianas	16
Vibrionales - <i>Vibrio cholerae</i>	16
Pseudomonadales - <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
Rhodobacterales - <i>Ruggeria pomeroyi</i>	17
Rickettsiales - <i>Candidatus pelagibacter</i> sp. GTCC7211	17
Diversidade	18
Função funcional	18
Análise química e físico-química	19
CONCLUSÃO	19
REFERÊNCIAS	20
ANEXO 1	26
Inferência metabólica por conjunto funcional e hits (Foram inseridas apenas 50 linhas de 400, em um corte até 100 hits)	26

INTRODUÇÃO

A vida microbiana permeia a terra há bilhões de anos sendo os seres mais antigos do planeta. Em contrapartida, a sua compreensão ainda perpassa uma fração muito pequena de tudo que existe (Madigan, 2010). Em alguns compartimentos da Terra sua representatividade pode ser a maior parcela, como ocorre nos oceanos onde a biomassa de pico, femto e nanoplâncton corresponde pela maior parte em comparação com os demais organismos (Kirchman, 2008).

A microbiologia tem como um dos grandes propósitos não só compreender toda essa cadeia e funcionamento mas também a “aplicação do nosso entendimento acerca da microbiologia para benefício da humanidade e do planeta Terra” (Madigan, 2010). Neste sentido travamos um impasse pois apenas 1% das bactérias são cultiváveis, ou seja, uma fração muito grande permanece desconhecida mas que permeia a Terra há muito tempo (Connon and Giovannoni 2002).

As bactérias são organismos extremamente adaptados a condições de ampla variação de temperatura, pressão, disponibilidade de nutrientes e outros fatores. Esta capacidade adaptativa faz com que estejam presentes em todos os compartimentos (água, ar e terra), altitudes e profundidades, e ecossistemas em quantidade.

Essa rede microbiana é capaz de interagir com todas as demais formas de vida e em todos os níveis da teia trófica, sendo capaz de alterar fisiologicamente e biogeoquimicamente o ambiente ao qual está inserida (Melloni R. et al. 2004, Bazzicalupo & Okon, 2000, Madigan et al. 2000). Ou seja, desvendar o mundo bacteriano é ter condições de compreender melhor todos os ciclos que ocorrem nas comunidades, ecossistemas e nichos ecológicos.

A microbiologia e meio ambiente

No meio ambiente, os micro-organismos fazem parte de processos essenciais à vida e são muitas vezes utilizados como indicadores de mudança de qualidade do solo (Grisi, 1995), água (monitoramento dos níveis de *Escherichia coli*) e ar principalmente em sua relação na transmissão de doenças (Rondon et al, 2000).

Além de serem capazes de armazenar nutrientes, o conhecimento da estrutura da comunidade microbiana é fundamental na decisão de práticas de manejo indicadas para recuperação de áreas degradadas ou até mesmo na melhora da qualidade ambiental (Matsuoka et. al., 2003; Turco et al., 1994; Santana & Bahia Filho, 1998; Doran & Parkin, 1994).

Atualmente as bactérias vêm sendo utilizadas para diversas áreas e vem sendo altamente exploradas no ramo da biotecnologia, principalmente no que diz respeito a tratamento de água (Castro Silva, 2014) e esgoto (Henrique, 2010), biorremediação de solo e águas subterrâneas contaminadas por óleo (Pinto, 2006) e outros aplicados à engenharia ambiental.

Ecologia de micro-organismos

As relações ecológicas envolvendo micro-organismos afetam toda teia trófica, mas deve se chamar atenção por serem os principais produtores primários marinhos desencadeando diversas respostas (Kirchman 2008), interferindo em ciclos essenciais a existência e manutenção dos seres vivos fazendo parte da ciclagem de matéria, energia e informação genética em grande escala (Fuhrman 1999; Canchaya, Fournous et al. 2003; Suttle 2005; Azam and Malfatti 2007; Choi and Kim 2007; Suttle 2007; Kirchman 2008; Massana and Logares 2012). Neste último ponto, em relação a ciclagem de elementos, as bactérias têm papel fundamental no ciclo do nitrogênio, carbono e enxofre que são essenciais a vida da maioria dos organismos pois garantem sua fixação e assimilação por outros consumidores (Lengeler et al, 1999).

Por muito tempo se defendeu que as bactérias tinham todo seu ciclo individualizado, ou seja, não interagiam com qualquer outro micro-organismo, respondendo apenas a estímulos individualizados (Madigan, 2010). Atualmente, sabe-se que além de se comunicarem entre espécies são capazes de gerar

respostas em outros grupos a partir do *quorum sensing* (comunicação química), sendo então capazes de captar respostas de plantas por exemplo ou outras bactérias (WHITEHEAD et al., 2001; BAI & RAI, 2011). Esta comunicação é capaz de induzir mecanismos de regulação de expressão de genes e metabolismo sendo capaz de modificar condições bioquímicas locais, tamanho das populações (Miller & Bassler, 2001; Keller & Surette, 2006) e até mesmo levar a respostas coletivas onde a comunidade se comporta como um único indivíduo para que se favoreça sua sobrevivência (Fuqua Et Al., 2001; Rumjanek Et Al., 2004; Pinto, 2005; Ammor Et Al., 2008).

Outra ferramenta importante utilizada por micro-organismos para sua adaptabilidade e manutenção de suas comunidades, é a transferência horizontal de genes, ou seja, a troca de material genético com outros micro-organismos que exercem funções diferentes no ambiente (Brown, 2003; Lawrence, 2002). Esta transferência garante habilidade novas mas que não necessariamente serão mantidas para populações futuras pois respondem às variações externas e necessidade de modulação fisiológica, ambiental e genética (Arber, 2000; Solomon & Grossman, 1996).

Reconhecer as funções metabólicas não só permite maior compreensão das funções ecológicas presentes nas amostras mas consequentemente seu potencial econômico, tendo assim sido mapeados diversos genomas ambientais para tal fim (Goll et al, 2010).

Avanços tecnológicos na área de metagenômica por shotgun e ecologia de vírus

A dificuldade de cultivo de grande parte dos micro-organismos tornou-se um grande impasse para o avanço da microbiologia, abrindo espaço para o crescimento e desenvolvimento de abordagens independentes de cultivo (Hartmann et al. 1997, Liesack et al. 1997). O avanço tecnológico e consequente queda dos preços dos equipamentos de sequenciamento também tiveram seu papel no aumento das

análises de genomas ambientais já que este deixaram de ser fator crucial para investidas de novas pesquisas (Streit and Schmitz 2004; Medini, Serruto et al. 2008).

Inicialmente, em 2004, Handelsman et al utilizou pela primeira vez o termo metagenômica, sendo este o estudo a partir do sequenciamento do DNA obtido da análises ambientais que permite a análise da estrutura da comunidade a partir da riqueza, abundância e distribuição das espécies e também, suas funções metabólicas (Tyson, 2004).

Analisar todas os genomas de uma comunidade sempre foi algo fora da realidade, principalmente quando o assunto são os micro-organismos, porém, nas últimas décadas a partir dos avanços tecnológicos se tornou possível analisar desde uma árvore até um vírus (Tuskan, 2006. Warren, 2008).

Esta etapa da microbiota sempre foi considerada uma caixa preta, sem que pudesse correlaciona-la aos outros níveis da teia trófica ou então compreender sua real importância, como hoje por exemplo sabemos a função primordial dos micro-organismos na composição do solo e sua eficiência tratando-o muitas vezes na engenharia ambiental como um 'ser vivo' (Rondon et al, 2000).

Conhecer estes organismos trás um avanço na ciência sobre sua participação ecológica, estabelecendo relação conectando todas as etapas de uma história da então chamada Nova ecologia (Eguiarte, 2007). Em geral, a ecologia tem como pilstras que vão desde a Ecofisiologia (estudo das alterações dos indivíduos com ambiente físico) até a Ecologia de Ecossistemas (compreensão dos fluxos de energia e matéria) e em todas elas nunca havia sido considerado os micro-organismos como parte, já que não podiam ser cultivados e compreendidos (Rosso & Eguiarte, 2008).

A valorização desta comunidade invisível a olho nu foi ganhando espaço quando foi reconhecido que a maior produção de CO₂ é proveniente de arqueias e bactérias (Kluyver, 1956) e que estes fazem parte da maior biomassa e diversidade do planeta (Rosso & Eguiarte, 2008). Começava-se então, a ir atrás dos 99% dos organismos não cultiváveis (Amann, 1990).

Os primeiros trabalhos de genômica criaram bibliotecas de clones de bactérias de solo agrícolas (Rondon et al, 2000) e despontaram em uma sequência de análises que se deram em função do barateamento dos processos de

sequenciamento em larga escala, principalmente o shotgun e pirosequenciamento (Minckley, 1994).

Neste contexto, começou-se a tornar possível que misturas de material genético de toda a comunidade microbiana complexa pudessem ser analisados fragmentados. Ou seja, o DNA fragmentado é analisado permitindo estudos taxonômicos e funcionais, extraíndo diversas hipóteses de como está o comportamento do ecossistema e relação entre a microbiota, até mesmo em frações de vírus (Tringe, von Mering et al. 2005; Dinsdale, Edwards et al. 2008; Simon and Daniel 2011).

Focando na técnica de shotgun, a mesma utilizada neste trabalho, é trazido a inovação de se trabalhar com diversas sequências fragmentadas em um processo sequencial de:

1. Fragmentação do genoma sequências curtas;
2. Amplificação dos fragmentos via PCR para aumentar o sinal de sequência;
3. Sequenciamento de alto desempenho Illumina onde adaptadores são inseridos e o sequenciamento feito em tempo real com dinucleotídeos rever veis marcados com fluorescência;
4. Anotação das amostras via banco de dados existentes;
5. Arquivo final para tratamento estatístico com perfil taxonômico e funcional.

O Porto de Santos

O Porto de Santos e consequentemente o estuário Santista-Vicentino tem um histórico antigo de ocupação que perpassa meados da década de 70, quando instalou-se a Cosipa (Pontes, 2001:46). A partir de então a Companhia das Docas começa a ocupar e impulsionar a expansão do porto que chega até o bairro Ponta da Praia, partindo da Alemoa e migra para a margem do município do Guarujá (Schiavon et alii,1986).

Neste cenário geográfico criado, além de diversas transações e transporte de

cargas, a memória de acidentes ambientais e atualização delas por novos acidentes se tornou recorrente. Pode-se citar pelo menos três acidentes relevantes como o da Ultracargo, onde tanques de combustível queimaram por 8 dias, Copersucar com a queima de toneladas de açúcar e da LocalFrio, com o vazamento e formação de nuvem tóxica seguido de queima.

Estes tópicos são apenas exemplos pontuais de parte das pressões exercidas sobre os recursos naturais, que impactam negativamente a biota que muitas vezes sofre diminuição ou perda de habitats/biodiversidade (Diodato, 2003). Outro exemplo de impacto é a devolução de rejeitos e efluentes ao ambiente (ICB UFMG, 2003), grandes inundações, impermeabilização do solo e outros (Spadotto, Aryane et al, 2011).

Caso da LocalFrio: dicloroisocianurato de sódio dihidratado

Em Janeiro de 2016, um vazamento seguido de explosão no Terminal da Local Frio na margem do Guarujá, do Porto de Santos, encobriu as cidades de Santos e Guarujá com uma nuvem tóxica formada principalmente por dicloroisocianurato de sódio dihidratado. Durante o período chuvas prolongadas ocorreram permitindo a inserção do composto em meio aquático, ao qual em contato com a água disponibiliza cloro.

Parte do relatório da CETESB que descreve o acontecido está reportado na imagem abaixo:

*Informamos que técnicos da Agência Ambiental de Santos acompanharam o sinistro de incêndio nos contêineres do terminal da Localfrio, na Margem Esquerda do Porto de Santos, em Vicente de Carvalho (distrito de Guarujá), desde o seu início em 14 de janeiro de 2016, por volta das 15h15. É importante ressaltar que o acionamento do plantonista da CMN foi efetuado por diversos registros de reclamação da população.

A ocorrência foi iniciada por uma provável ruptura em um contêiner contendo o produto Dicloroisocianurato de Sódio Dihidratado, que estava ensacado em 20 (vinte) big bags, de uma tonelada cada, em forma de grãos que permitiu a entrada de água de chuva e a reação química. O produto criou uma reação exotérmica, formando combustão química, ocasionando fogo e explosões, resultando a liberação de gases tóxicos para atmosfera. Com o passar das horas, vários contêineres (66) foram envolvidos no sinistro: 40 (quarenta) contêineres contendo Dicloroisocianurato de Sódio Dihidratado; 07 (sete) contêineres contendo Symclosene (pastilhas piscina); 03 (três) contêineres contendo Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético (herbicida); 01 contêiner contendo Ácido Piridineloxialcanóico (agrotóxico); 01 contêiner contendo Óleo Isolante de Capacitor; 01 contêiner contendo Cloreto de Cálcio Dihidratado; 01 contêiner contendo Fenpyroximate (inseticida); 01 contêiner contendo Difenilamina (antioxidante/estabilizador de polímeros); 01 contêiner contendo Methoxyfenozide Technical / Diacilidrazina (inseticida); 01 contêiner contendo Goal Technico II / Éter Diacilidrazina (herbicida); 01 contêiner contendo Arame galvanizado; 01 contêiner contendo Resina Epoxi; 01 contêiner contendo Chlorhexidine Gluconate (sabonete líquido); 01 contêiner contendo Nitrato de Potássio (fertilizante); 01 contêiner contendo Pistache; 01 contêiner contendo Cloreto de Sódio; 01 contêiner contendo Paraloid (resina termoplástica); 01 contêiner contendo Óxido de Difenila (retardante: indústrias de perfumes e sabões); 01 contêiner contendo Hidroperóxido (agente branqueador); que liberaram substâncias tóxicas para atmosfera (com cores distintas e partículas) que atingiram além dos bairros contíguos ao terminal, Vicente de Carvalho (distrito de Guarujá), bem como regiões habitadas dos municípios de Santos, São Vicente e Cubatão.

Figura 2. Fragmento de ofício resposta da CETESB sobre o acidente da LocalFrio. (Cetesb, 2061).

OBJETIVO

Descrever através da metagenômica por *shotgun* o picoplâncton no estuário de Santos antes e após introdução acidental de dicloroisocianurato de sódio dihidratado.

Objetivos específicos

- 1) Descrever taxonomicamente e funcionalmente o picoplâncton no estuário de Santos antes e após a introdução acidental de dicloroisocianurato de sódio dihidratado;
- 2) Elaborar uma biblioteca de genes microbianos para estudo da região;
- 3) Discorrer sobre a importância das bactérias para engenharia e análise de impacto ambiental.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local de estudo

Inicialmente o projeto, incorporado a um grupo de análises maior, contava com 4 pontos de coletas sendo um deles no estuário de Santos, SP. De modo inesperado, o ponto de análise escolhi no estuário foi realizado (em função das condições de salinidade) exatamente em frente a um terminal onde, tempo depois, ocorreria um acidente ambiental. Com este ponto posto, esclarecemos como foi guiado o local de estudo e o projeto apresentado neste documento.

Desta forma, a coleta foi realizado a margem esquerda do Porto de Santos, no município do Guarujá, nos intermédios do Terminal da LocalFrio, antes e depois do vazamento dos containers com material tóxico, especificamente nas datas de 09/01/2016 e 19/01/2016. O ponto de coleta está demonstrado abaixo:



Figura 3. Região de coleta. Estuário de Santos, São Paulo, Brasil. (fonte: <https://www.google.com.br/maps/@23.9048713,46.3341222,12z>).

Amostragem do material

Foram coletados 100l de água subsuperficial (0,51m de profundidade) a partir de bombeamento manual com bombonas infláveis pré-lavadas com água local (evitando que pudesse haver contaminação cruzada) em 5 galões. Durante o período de coleta foi ainda coletado informações sobre os parâmetros físico-químicos locais, sendo estes:

- temperatura, Ph, condutividade, turbidez, oxigênio dissolvido, salinidade, ORP (potencial de oxi-redução).

Imediatamente após coleta o material foi levado ao Laboratório Multiusuários de análises físico-químicas e biologia molecular do Departamento de Ciências do Mar, onde foi realizado toda pré-processamento do material e separação das frações.

Procedimento imediato do material amostrado

Uma alíquota congelada de cerca de 100-150 ml de amostra para análise química em tubos novos (50ml). Alíquotas de ~1,5 ml, em duplicata, foram fixadas com glutaraldeído, paraformaldeído, ou uma mistura dos dois, e congeladas em nitrogênio líquido, para posterior análise por citometria de fluxo. O maior volume da água (60-80L) foi pré-filtrado (50µm) e submetido a filtração tangencial, utilizando cartucho de 100 kDa. O concentrado de cerca de 500ml foi passado por membrana de 3µm para separação de frações maiores do plâncton, seguida de Sterivex 0.22µm para concentração do picoplâncton. Este recebeu tampão SET (sacarose 20%-Tris 50mM EDTA 50mM) e foi congelado a -20° até a extração de DNA.



Figura 4. Equipamento para filtração tangencial. Descrição dos equipamentos: 1) Bomba peristáltica; 2) Cartucho de filtração tangencial; 3) Mangueira para entrada de água; 4) Mangueira para saída de água; 5) Mangueira para água filtrada; 6) Isopor para suporte; 7) Fita adesiva; 8) braçadeiras para conexões (orings e conexão funil estão presos a elas); 9) TEE; 10) Manômetro.

Citometria de fluxo

A citometria foi realizada no laboratório de Hidrobiologia da UFRJ seguindo os procedimentos descritos em Gregoracci, Nascimento et al em 2012, a partir de alíquotas de ~1,5 ml em criotubo para receber os fixadores. com 1% de paraformaldeído e 0,5% de glutaraldeído para a contagem de bactérias e arqueias. O tubo foi agitado por inversão e incubados por 10 min de ação, em sequência foram congelados em nitrogênio líquido e encaminhados ao laboratório. As quantidades de bactérias foram mensuradas por coloração por epifluorescência com Syto 13.

Análises de DNA

A extração do picoplâncton envolveu incubação com proteinase K e lise com

CTAB em filtro, com desproteinização com clorofórmio e precipitação com etanol.

Sequenciamento de alta performance

O DNA microbiano foi fragmentado (segundo protocolo NEXTERA NXT) e sua qualidade verificada por fluorescência (Qubit), eletroforese em capilar (Bioanalyzer) e PCR em tempo real (Kappa/Life) previamente ao preparo de bibliotecas. As bibliotecas foram montadas com *barcodes* segundo protocolos do fabricante. O sequenciamento foi realizado na plataforma MiSeq do Illumina utilizando o kit v3, também segundo protocolos do fabricante, em pares (*pair end*).

Tratamento do sequenciamento

Foi empregado um *workflow* caseiro para limpeza e controle de qualidade das sequências. Os dados resultantes em formato *fastq* (incluindo qualidade das bases) foram limpos através de *Dynamic trimming* utilizando Solexa A++ (Cox et al, 2010). Leituras menores de 75 bp foram consideradas erros e removidas com script caseiro em Perl. Os pares foram alinhados utilizando o software livre PAIR FQ e unidos com o PANDA SEQ (Masella et al 2012). Pares não-unidos dessa forma foram alinhados e separados por um N e incluídos na análise como *singlets*.

O servidor online para anotação e armazenamento das sequências metagenômicas foi o MGRast (Meyer, Paarmann et al. 2008; Sun, Chen et al. 2011). Após isto foram utilizados índice de diversidade (Shannon e Neff de Shannon), comparações par a par via STAMP e inferências funcionais via FAPROFAX (Louca et al, 2016).

RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

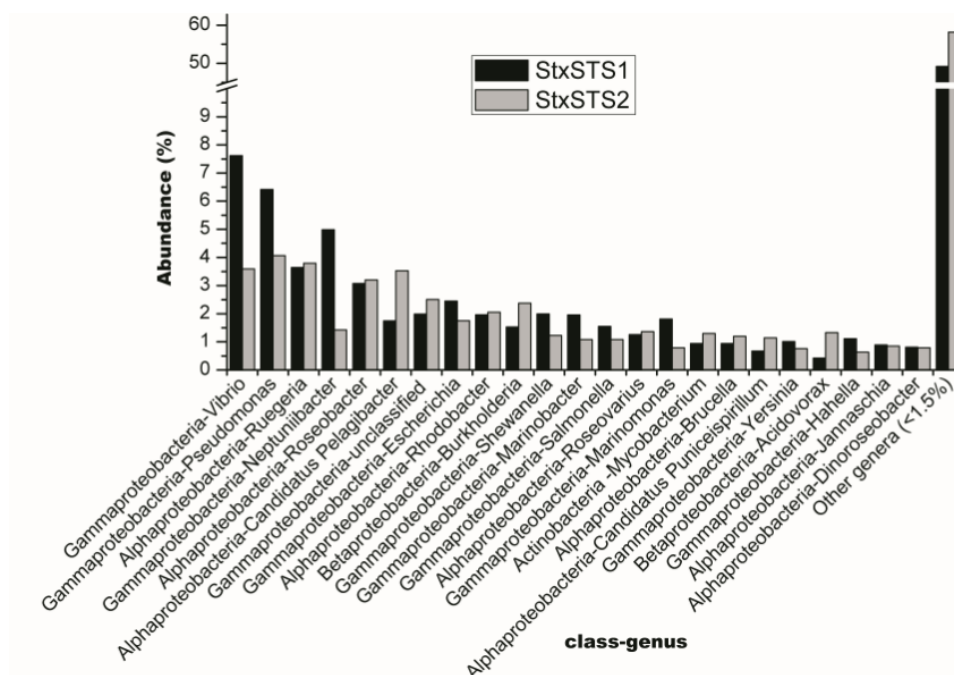


Figura 5. Abundância funcional amostras STS 1 e 2 ordem/espécie e classe/gênero.

Em sequência foi realizado uma análise mais aprofundada de diversidade a partir dos índice diversidade de Shannon H com correção de Neff para número efetivo de indivíduos:

STS 1		STS 2	
Richness	4408	Richness	4710
SS	36,0525567347	SS	38,9475866954
SQ	32,9866322656	SQ	36,5560117314
H	5,7433990168	H	6,0461567736
S^2H	7,60790703017567E-07	S^2H	7,23332248186264E-07
Neff	312,1235230756	Neff	422,4861958143

Figura 6. Imagens dos cálculos realizados para Shannon H e Neff.

Entrando na temática sobre carga funcional a análise tende a acompanhar a mesma forma em relação a abundância e está expresso no gráfico abaixo:

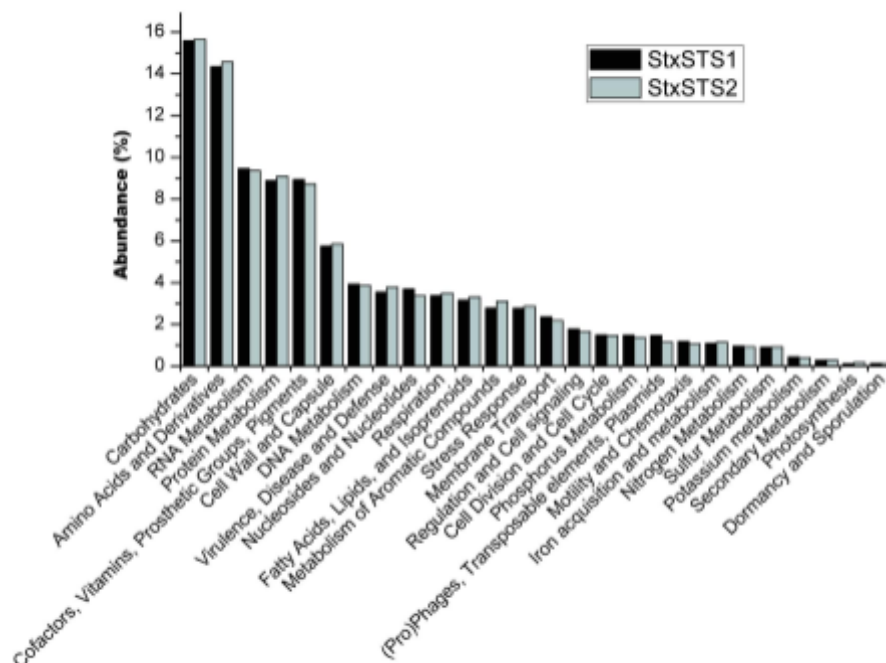


Figura 7. Abundância funcional amostras STS 1 e 2.

Este tipo de abordagem não permite que muitas respostas sejam obtidas de formas menos complexas, para tal nos apoiamos no aplicativo FAPROFAX desenvolvido por Louca et al (2016) onde nos foi gerado uma tabela relacionando os dados taxonômicos e funcionais a partir de uma biblioteca com os principais metabolismos (Anexo 1).

No momento das amostragens foram coletados também fatores físico-químicos com sonda multiparâmetros Horiba U52. Foi separada uma fração da amostra é encaminhada para análises químicas, os resultados estão na figura abaixo:

Sample	Salinity (ppt)	Temperature (°C)	pH	Conductivity (S/m)	Dissolved Oxygen (mg/L)	ORP (mV)	TDS (g/L)
STS1	25,42	24,50	8,37	4,00	7,48	224,83	24,38
STS2	19,78	24,44	8,34	3,17	7,08	174,00	19,35
Sample	Ammonium (µM)	Nitrite (µM)	Nitrate (µM)	Total Nitrogen (µM)	Silicate (µM)	Orthophosphate (µM)	Total Phosphorus (µM)
STS1	3,63	1,73	2,67	31,58	6,26	2,71	4,09
STS2	11,21	1,76	11,52	40,31	10,81	7,99	8,31

Figura 8. Resultados das análises físico-químicas e químicas.

Para compreender quais variáveis químicas e físico-químicas mais geraram deslocamento em nosso amostral, foi realizada a Análise de Componentes Principais (PCA) tanto para STS 1 quanto para 2 e demais amostras fruto do projeto que financiou esta pesquisa Processo FAPESP n °13/21745-4. Estes outros amostrais foram inseridos para que pudesse ser gerado o gráfico, porém não serão levados em consideração para discussão deste trabalho.

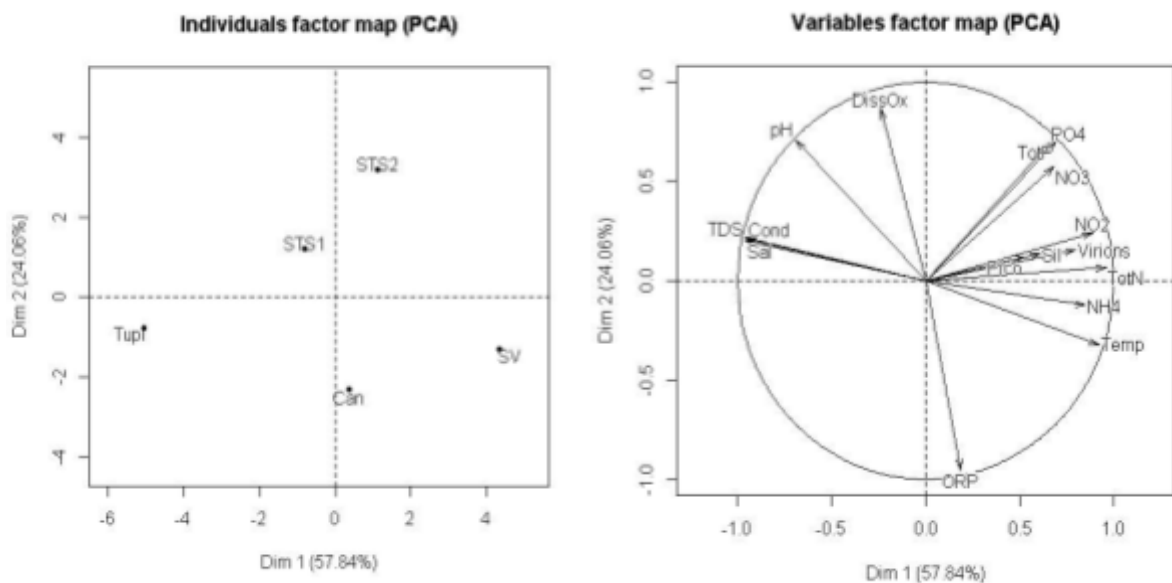


Figura 9. Análise por PCA de todas amostras do projeto FAPESP nº 13/21745-4.

DISCUSSÃO

Visão geral taxonômica

O oceano, um dos ecossistemas com grande biomassa bacteriana, possui sua composição bem diferenciada porém com grupos muito marcados, como o domínio de proteobactérias. Esta mesma relação foi encontrada em nossas amostras como era de se esperar principalmente pelos grupos *Gamma* e *Alphaproteobacteria*, conforme apresentado nas imagens abaixo e comparado ao

gráfico de classe/gênero, onde praticamente a totalidade é composta por proteobactérias:

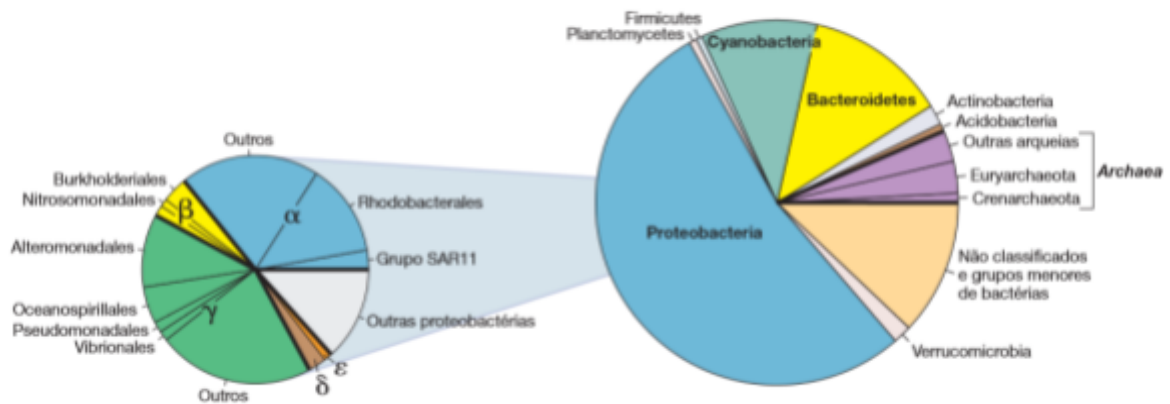


Figura 10. Distribuição procariótica dos oceanos (Madigan, 2010).

Ainda discutindo sobre a abundância é importante chamar atenção ao volume de dados gerados e a quantidade de hits obtidos. Foram 7.337.951 milhões de hits para as duas amostras, sendo 54,93% para STS 1 e 45,-7 para STS 2, esta vastidão de dados faz com que a maioria dos testes convencionais estatísticos não sejam aplicados, pois a grande quantidade de hits permite que haja variação estatística mesmo com valores de p-value baixos, já que um valor próximo de 0 pode representar milhares de hits. Esta discussão será feita novamente a frente.

Esta diminuição da abundância será discutida ao longo desta discussão, pontuando principalmente grupos principais que apresentem variações como reduções entre uma amostra e outra ou aumento.

Análises bacterianas

Para as análises de abundância será dada atenção a 4 espécies sendo duas que apresentaram queda entre STS 1 e 2, e outras que apresentaram aumento. A proposta nesta análise é buscar hipóteses para compreender estas alterações após o acidente.

Vibrionales - *Vibrio cholerae*

São bactérias móveis com forma de bastonetes curvos que podem se associar em forma de S e possuem um único flagelo para locomoção(Ryan, 1994). São bactérias gram negativas que crescem em condições de aerobiose ou anaerobiose em PH entre 8 e 9,5,

são ainda fermentadoras e redutoras de nitrito a nitrato e estão presentes na maioria dos ecossistemas fixados em outros organismos, biofilme ou em vida livre (Henry, 2001).

É a espécie causadora da cólera porém apenas algumas linhagens são patogênicas, sendo na ASIA O1 e O139 e na América Latina variante eltor (CDC, 2015).

Entre STS 1 e 2 foi verificado a diminuição desses organismos, mesmo com a condição de pH estando favorável (8,3 e 8,24) e em função da alta ocupação humana com deságue de esgoto e próprias condições do estuário, o fornecimento de nutrientes não seria fator limitante. Um ponto a se levar em consideração para esta redução é a sensibilidade de bactéria a ácidos (Henry, 2001) e a queima de 3 contêiner de Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético (Anexo 2) que atingiram as águas pela mistura atmosféricas e também carregadas pela chuva.

Pseudomonadales - *Pseudomonas aeruginosa*

É uma bactéria gram negativa, de espécie patogênica principalmente para infecções urinárias e respiratórias, sendo uma oportunista, principalmente a espécie *Pseudomonas aeruginosa*. Esta bactéria pode ter sua influência e redução de abundância relativa no ponto de amostra pela diminuição da ocupação do bairro Conceiçãozinha, pela evacuação da área solicitada pela Prefeitura do Guarujá, o que gerou menor produção de esgoto in natura.

Rhodobacterales - *Ruggeria pomeroyi*

Esta bactéria foi descoberta em 1998 por Uchino et al, aeróbica e requer NaCl ou dependência de ambiente marinho para crescer (Lee, 2007). Nas análises foi verificado que houve crescimento, potencialmente isto pode ter ocorrido pela diminuição da concorrência pela diminuição de outras espécies.

Rickettsiales - *Candidatus pelagibacter sp. GTCC7211*

É uma bactéria marinha, com crescimento também em água salobra, que não incorpora enxofre, dependendo da redução de elementos orgânicos, utilizando metionina, dimetilsulfonopropionato e metanotiol. Seu aumento pode ser inferido

pela sua adaptabilidade a ambiente marinho e salobro, que durante o acidente pode ter sido beneficiado pela quantidade de chuvas e fluidos utilizados para apagar o incêndio.

Diversidade

Em questão de diversidade notamos aumento representativo das amostras de STS 1 e STS 2 passando de 312 para 422 espécies efetivas de Shannon, ou seja, um acréscimo superior de de 1%, aparentemente esta número não parece representativo porém quando levamos em consideração hits superiores aos milhares esta resposta se mostra importante.

Este mesmo tipo de análise deve ser interpretado também para a diferença significativa entre as espécies, que mesmo quando apresentam um p value muito próximo a 0, estes não podem ser desconsiderados pois o espectro de hits é muito grande, trazendo mais confiança nas análises.

Função funcional

Seguindo a análise funcional pelas respostas do FAPROFAX, já que as análises metabólicas em level 1 tem um grau de aprofundamento superficial e o nível 4 é demasiado aprofundado tornando muito complexa a análise, destacamos os três mais abundantes:

aerobic_chemoheterotrophy	592887	424917	1017804
aerobic_chemoheterotrophy and photoheterotrophy	279528	243839	523367
methanol_oxidation	164192	190791	354983

Figura 11. fragmento do Anexo 1 da analise do FAPROFAX.

Percebemos a predominancia de sistemas aeróbicos, quimioheterótrofos e fotoheterotróficos, ou seja, são metabolismos bastante recorrentes e que podem ocorrer em qualquer tipo de ecossistema. Chama-se atenção ao metabolismo de

oxidação metanol, um recurso disponível em larga escala na região de estuário de Santos pelo alto fluxo de embarcações e vazamentos constantes de combustíveis.

Análise química e físico-química

Não foram notado variação importante nas análises físico-químicas dentre as duas amostras, mostrando que estas não foram significativas para alterar a abundância e diversidade, porém, quando tratamos das análises químicas pelo PCA vemos que as amostras se distinguem.

No primeiro caso, não é tão relevante os fatores de nutrição como nitrogênio e fosfato serem os pontos que mais alteraram as amostras, sendo estes em sua maioria PH e Oxigênio dissolvido. No segundo caso o fosfato e nitrogênio arrastam a amostra, porém não é possível relacioná-lo com o acidente já que estes não possuíam em sua composição este tipo de compostos.

CONCLUSÃO

Ao final deste trabalho verificamos que é necessário seguir com experimentos na área para que possamos conhecer relações ecológicas bacterianas na região do Porto de Santos, principalmente pela recorrência de impactos, para identificar interferências indiretas em outras teias tróficas e até mesmo na produção de matéria e fluxo de energia.

Neste estudo, não ficou claro as alterações ocorridas antes e após o acidente, porém temos agora, pela primeira vez no nível do picoplâncton uma análise e criação de biblioteca bacteriana da região.

Releva-se a importância que estes estudos sejam iniciados e continuados em níveis de pós graduação pelo tempo que precisam e nível de conhecimento e estudo na área biológica, ecológica, informática e microbiológica.

REFERÊNCIAS

1. ANDRADE, Juliano de Almeida; AUGUSTO, Fabio; JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes, (2010). Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclet. Quím.*, São Paulo , v. 35, n. 3, p. 17-43, Setembro. 2010.
2. Amann, R.I., et al. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and environmental microbiology* 56(6),1919-1925 (1990).
3. Arahal et al, 2007. *Neptuniibacter caesariensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine genome-sequenced gammaproteobacterium. [*Int J Syst Evol Microbiol.*](#) 2007 May;57(Pt 5):1000-6.
4. Arber, W. (2000) Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 1-7.
5. Arrigo, K. R. (2005). "Marine microorganisms and global nutrient cycles." *Nature* 437(7057): 349355.
6. Azam, F., T. Fenchel, et al. (1983). "The Ecological Role of Water Column Microbes in the Sea." *Marine Ecology Progress Series* 10: 257263.
7. Azam, F. and F. Malfatti (2007). "Microbial structuring of marine ecosystems." *Nat Rev Microbiol* 5(10): 782791.
8. Breitbart, M., A. Hoare, et al. (2009). "Metagenomic and stable isotopic analyses of modern freshwater microbialites in Cuatro Ciénegas, Mexico." *Environ Microbiol* 11(1): 1634.
9. Brown, J. (2003) Ancient Horizontal Gene Transfer. *Nature Reviews-Genetics*,4: 121-132.
10. Brussaard, C. P. (2004). "Optimization of procedures for counting viruses by flow cytometry." *Appl Environ Microbiol* 70(3): 15061513.
11. Castro Silva, M. A et al (2004). O. G. Decusati 2 "Microrganismos associados ao tratamento de águas de abastecimento com coagulante orgânico vegetal (tanato quaternário de amônio) – i. microrganismos filamentosos." . *Revista Estudos de Biologia*, v. 26, n.54, p.21-27, Jan./Mar.

12. Canchaya, C., G. Fournous, et al. (2003). "Phage as agents of lateral gene transfer." *Curr Opin Microbiol* 6(4): 417424.
13. CB UFMG. "Avaliação de Impactos Ambientais". Disponível em <http://www.icb.ufmg.br/>. Acesso em 12/05/2015, 12:53 h.
14. CDC (25/03/2005) - *Vibrio cholerae* não O não O139. <<http://www.bt.cdc.gov/disasters/hurricanes/katrina/vibrocholera.asp>>. Acessado em 25/03/2005
15. Chibani Chennoufi, IS., A. Bruttin, et al. (2004). "Phage Host interaction: an ecological perspective." *J Bacteriol* 186(12): 36773686.
16. Choi, I. G. and S. H. Kim (2007). "Global extent of horizontal gene transfer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(11): 44894494.
17. Comeau, A. M., G. F. Hatfull, et al. (2008). "Exploring the prokaryotic virosphere." *Res Microbiol* 159(5): 306313
18. Cannon, S. A. and S. J. Giovannoni (2002). "High Throughput methods for culturing microorganisms in very low nutrient media yield diverse new marine isolates." *Appl Environ Microbiol* 68(8): 38783885.
19. DeLong, E. F and Pace, N. R. (2000). "Environmental diversity of bacteria and archaea" *Syst Biol.* 2001 Aug;50(4):4708.
20. Dias, V. 2011. "Contaminantes afetam moradores do estuário de Santos". bDiponível em <http://www.usp.br/agen/?p=66452>. Acessado em 12/05/2015, 12:50h.
21. Dinsdale, E. A., R. A. Edwards, et al. (2008). "Functional metagenomic profiling of nine biomes." *Nature* 452(7187): 629632.
22. Dinsdale, E. A., O. Pantos, et al. (2008). "Microbial ecology of four coral atolls in the Northern Line Islands." *PLoS One* 3(2): e1584.
23. Diodato, M. A, 2003. "Estudos de impactos ambientais" Tópicos Especiais em Geografia Universidade Federal do rio Grande do Norte Pós Graduação Geografia
24. Eguiarte, L.E., Souza, V. & Aguirre, X. *Ecología Molecular* (INE, SEMARNAT, CONABIO, UNAM, México, D.F., 2007)
25. Falkowski, P. G., T. Fenchel, et al. (2008). "The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles." *Science* 320(5879): 10341039.

26. Fuhrman, J. A. (1999). "Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects." *Nature* 399(6736): 541548.
27. Gilbert, J. A., D. Field, et al. (2010). "The taxonomic and functional diversity of microbes at a temperate coastal site: a 'multiomic' study of seasonal and diel temporal variation." *PLoS One* 5(11): e15545.
28. GOLL, J., et al. METAREP: JCVI metagenomics reports—an open source tool for high-performance comparative metagenomics. *Bioinformatics*, vol. 26, n. 20, p. 2631–2632, aug. 2010.
29. Grasshoff, K., K. Kremling, et al. (1999). *Methods of seawater analysis*. Weinheim, Germany, Wiley VCH Verlag.
30. Weinheim, Germany, Wiley VCH Verlag.
31. Gregoracci, G. B., J. R. Nascimento, et al. (2012). "Structuring of bacterioplankton diversity in a large tropical bay." *PLoS One* 7(2): e31408.
32. Grisi, B. M. Biomassa e atividade de microrganismos do solo: revisão metodológica. *Revista Nordestina de Biologia*, João Pessoa, v. 10, n. 1, p. 1-22, 1995.
33. HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 68, n.4, p. 669–685, dez. 2004.
34. Hambly, E. and C. A. Suttle (2005). "The virosphere, diversity, and genetic exchange within phage communities." *Curr Opin Microbiol* 8(4): 444450
35. Henrique, I.N. et al, (2010). Remoção biológica de fósforo em reatores em bateladas sequenciais com diferentes tempos de retenção de sólidos *Eng Sanit Ambient* | v.15 n.2 | abr/jun 2010 | 197-204.
36. Hernández, M. C. R., H. R. Saad, et al. (2012). "Petroleum Influenced beach sediments of the Campeche Bank, Mexico: diversity and bacterial community structure assessment " *J. Env. Management* 95: S325S331.
37. HENRY, John B, (ed). *Clinical Diagnosis & Management by Laboratory Methods*. USA: Saunders, 20th Edition, 2001. ISBN 0-7216-8864-0.
38. Joint, I., M. Muhling, et al. (2010). "Culturing marine bacteria an essential prerequisite for biodiscovery." *Microb Biotechnol* 3(5): 564575.
39. Kennedy, J., B. Flemer, et al. (2010). "Marine metagenomics: new tools for the study and exploitation of marine microbial metabolism." *Mar Drugs* 8(3):

608628.

40. Kirchman, D. L., Ed. (2008). Microbial ecology of the oceans. New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.

41. Kluyver, A.J. & van Niel, C.B. The Microbe's Contribution to Biology (Harvard University Press, Cambridge, MA, 1956).

42. Lawrence, J. G. (2002) Gene Transfer in Bacteria: Speciation without Species?. Theoretical Population Biology, 61: 449–460.

43. Ruegeria pelagia sp. nov., isolated from the Sargasso Sea, Atlantic Ocean Kiyong Lee,¹ Yoe-Jin Choo,¹ Stephen J. Giovannoni² and Jang-Cheon Cho International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2007), 57, 1815–1818 DOI 10.1099/ijs.0.65032-0

44. Louca et al. (2016) Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. [Science](#). 2016 Sep 16;353(6305):1272-7. doi: 10.1126/science.aaf4507.

45. Lyra, C. Lucio, G et al, 2015. "Incêndio provoca explosões em área industrial de Santos, SP". Disponível em <http://g1.globo.com/sp/santosregiao/noticia/2015/04/incendioatingeindustrianoabairroalemoaemsantoslitoraldesp.html>. Acessado em 12/05/2015, 12:52h.

46. Madigan, M. T., J. M. Martinko, et al. (2010). Brock Biology of Microorganisms 13th Edition, Benjamin Cummings.

47. Madsen, E. L. (2008). Environmental Microbiology: From Genomes to Biogeochemistry, Blackwell Publishing.

48. Massana, R. and R. Logares (2012). "Eukaryotic versus prokaryotic marine picoplankton ecology." Environ Microbiol

49. Medini, D., D. Serruto, et al. (2008). "Microbiology in the postgenomic era." Nat Rev Microbiol 6(6): 419-430.

50. Meyer, F., D. Paarmann, et al. (2008). "The metagenomics RAST server: a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes." BMC Bioinformatics 9: 386.

51. Minckley, W.L. A bibliography for natural history of the Cuatro Ciénegas basin and environs, Coahuila, Mexico. Proc Des 51 Fishes Counc 25, 47-64 (1994).

52. Parks, D. H. and R. G. Beiko (2010). "Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities." *Bioinformatics* 26(6): 715721.
53. Pomeroy, L. R., P. J. I. Williams, et al. (2007). "The Microbial Loop." *Oceanography* 20(2): 2833.
54. Prefeitura de cubatão, 2015. "Origem e Desenvolvimento. Disponível em <http://www.cubatao.sp.gov.br/historia/origemdesenvolvimento>. Acessado em 12/05/2015, 12:59h
55. Rademaker J.L.W., Hoste B., et al. (2000). "Comparison of AFLP and REP PCR genomic fingerprinting with DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system." *Soc. General Microbiology*.
56. Ryan, K.J.(ed). Sherri's Medical Microbiology - An Introduction to Infectious Diseases. USA: Appleton & Lange, third edition, 1994. ISBN 0-8385-8542-6
57. Rodriguez Brito, B., L. Li, et al. (2010). "Viral and microbial community dynamics in four aquatic environments." *ISME J* 4(6): 739751
58. Rodriguez Valera, F., A. B. Martin Cuadrado, et al. (2009). "Explaining microbial population genomics through phage predation." *Nat Rev Microbiol* 7(11): 828836.
59. Rondon, M.R., et al. Cloning the Soil Metagenome: a Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity of Uncultured Microorganisms. *Applied and environmental microbiology* 66(6), 2541-2547 (2000).
60. Roux, S., M. Faubladier, et al. (2011). "Metavir: a web server dedicated to virome analysis." *Bioinformatics* 27(21): 30743075.
61. Simon, C. and R. Daniel (2011). "Metagenomic analyses: past and future trends." *Appl Environ Microbiol* 77(4): 11531161.
62. Sharon, I., A. Alperovitch, et al. (2009). "Photosystem I gene cassettes are present in marine virus genomes." *Nature* 461(7261): 258262.
63. Solomon, J. M. & Grossman , A. D. (1996) Who's competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria *Trends in genetics*, 12 (4): 150-155.
64. Spadotto, A. Nora, D, D. 2011. "Impactos ambientais causados pela construção civil". *Unoesc & Ciência – ACSA, Joaçaba*, v. 2, n. 2, p. 173180, jul./dez. 2011).

65. Streit, W. R. and R. A. Schmitz (2004). "Metagenomics The key to the uncultured microbes." *Curr Opin Microbiol* 7(5): 492-498.
66. Suttle, C. A. (2005). "Viruses in the sea." *Nature* 437(7057): 356-361.
67. Suttle, C. A. (2007). "Marine viruses major players in the global ecosystem." *Nat Rev Microbiol* 5(10): 801-812.
68. Tamura, K., D. Peterson, et al. (2011). "MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods." *Mol Biol Evol* 28(10): 2731-2739.
69. Trentin, R., L. E. S. Robaina, et al. (2009). "Mapeamento geomorfológico da bacia hidrográfica do Rio Itu, Oeste do Rio Grande do Sul, Brasil." *Pesquisas em Geociências* 36(1): 95-105.
70. Tringe, S. G., C. von Mering, et al. (2005). "Comparative metagenomics of microbial communities." *Science* 308(5721): 554-557.
71. Tuskan, G.A., et al. The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313(5793), 1596-1604 (2006).
72. TYSON, G.W., et al. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, vol. 428, p. 37–43, mar. 2004.
73. Warren, W.C., et al. Genome analysis of the platypus reveals unique signatures of evolution. *Nature* 453(7192), 175-183 (2008).
74. Wen, K., A. C. Ortmann, et al. (2004). "Accurate estimation of viral abundance by epifluorescence microscopy." *Appl Environ Microbiol* 70(7): 3862-3867.

ANEXO 1

Inferência metabólica por conjunto funcional e hits (Foram inseridas apenas 50 linhas de 400, em um corte até 100 hits)

Rótulos de Linha	StxSTS1_all	StxSTS2_all	Total
aerobic_chemoheterotrophy	592887	424917	1017804
aerobic_chemoheterotrophy and photoheterotrophy	279528	243839	523367
methanol_oxidation	164192	190791	354983
unknown	153076	167813	320889
aerobic_chemoheterotrophy and fermentation and human_pathogens_all and human_pathogens_diarrhea and nitrate_reduction	183181	73903	257084
aerobic_chemoheterotrophy and methanol_oxidation	82096	133311	215407
aerobic_chemoheterotrophy and aromatic_hydrocarbon_degradation and dark_thiosulfate_oxidation and human_pathogens_all and human_pathogens_pneumonia and human_pathogens_septicemia and nitrate_denitrification and nitrate_respiration and plastic_degradation	116058	58759	174817
aerobic_chemoheterotrophy and fermentation and fumarate_respiration and human_gut and human_pathogens_all and human_pathogens_diarrhea and human_pathogens_gastroenteritis and nitrate_reduction and nitrate_respiration and nitrite_ammonification	96928	56816	153744
photoheterotrophy	73307	64025	137332
aerobic_anoxygenic_phototrophy and aerobic_chemoheterotrophy and anoxygenic_photoautotrophy_H2_oxidizing and	63488	57050	120538

anoxygenic_photoautotrophy_S_oxidizing and fermentation and nitrogen_fixation and photoheterotrophy			
aerobic_chemoheterotrophy and nitrate_reduction	76712	42533	119245
aerobic_anoxygenic_phototrophy and aerobic_chemoheterotrophy and photoheterotrophy	60294	51195	111489
fermentation and human_gut and human_pathogens_all and human_pathogens_gastroenteritis and nitrate_reduction and sulfite_respiration and thiosulfate_respiration	62421	35797	98218
aerobic_chemoheterotrophy and methanol_oxidation and photoheterotrophy	51405	40833	92238
aerobic_chemoheterotrophy and fermentation and human_pathogens_all and nitrate_reduction	62054	21497	83551
aerobic_chemoheterotrophy and fermentation and nitrate_reduction	57651	24652	82303
aerobic_chemoheterotrophy and aliphatic_non_methane_hydrocarbon_degradation and aromatic_hydrocarbon_degradation and hydrocarbon_degradation and nitrate_denitrification and oil_bioremediation	50085	21211	71296
fermentation	34022	34630	68652
animal_parasites_or_symbionts and intracellular_parasites and nitrate_respiration	32028	32835	64863
aerobic_chemoheterotrophy and methanol_oxidation and ureolysis	39634	25079	64713
aerobic_chemoheterotrophy and human_pathogens_all	29671	32886	62557
aerobic_anoxygenic_phototrophy and aerobic_chemoheterotrophy and nitrate_denitrification and photoheterotrophy	32602	26195	58797
aerobic_chemoheterotrophy and aromatic_compound_degradation and aromatic_hydrocarbon_degradation and dark_thiosulfate_oxidation and ligninolysis and manganese_oxidation and plastic_degradation	37373	20192	57565

fermentation and human_gut and human_pathogens_all and invertebrate_parasites and nitrate_reduction	33196	20681	53877
methanol_oxidation and photoheterotrophy	28012	25424	53436
aerobic_chemoheterotrophy and cellulolysis and chitinolysis and xylanolysis	32283	18588	50871
aerobic_anoxygenic_phototrophy and methanol_oxidation	25616	25008	50624
aerobic_chemoheterotrophy and human_pathogens_all and nitrate_respiration	19666	24277	43943
aerobic_chemoheterotrophy and human_gut and photoheterotrophy	23313	19943	43256
anoxygenic_photoautotrophy_S_oxidizing and dark_sulfide_oxidation and dark_sulfur_oxidation and dark_thiosulfate_oxidation and methanol_oxidation	22427	19993	42420
aerobic_chemoheterotrophy and aromatic_hydrocarbon_degradation and cellulolysis and dark_thiosulfate_oxidation and denitrification and invertebrate_parasites and ligninolysis and plastic_degradation	25725	14198	39923
aerobic_chemoheterotrophy and fermentation	19657	20008	39665
aerobic_chemoheterotrophy and ureolysis	17728	21767	39495
fermentation and human_gut and nitrate_reduction	22617	14193	36810
animal_parasites_or_symbionts and human_pathogens_all and methanol_oxidation and nitrate_reduction	22164	14155	36319
aerobic_chemoheterotrophy and aromatic_hydrocarbon_degradation and human_pathogens_all and nitrate_denitrification	23669	11880	35549
cellulolysis and methanol_oxidation	22468	12424	34892
fermentation and manganese_oxidation and nitrate_reduction and nitrate_respiration and nitrogen_fixation	18450	16401	34851
aerobic_chemoheterotrophy and human_gut	20224	14614	34838
aerobic_chemoheterotrophy and human_pathogens_all and nitrate_denitrification and nitrate_respiration and	21913	10976	32889

nitrous_oxide_denitrification			
aerobic_ammonia_oxidation and methanol_oxidation and ureolysis	17363	15419	32782
aerobic_chemoheterotrophy and dark_hydrogen_oxidation and dark_sulfide_oxidation and methanol_oxidation and methylotrophy and nitrate_denitrification and nitrate_respiration and photoheterotrophy	17548	14468	32016
aerobic_chemoheterotrophy and nitrate_denitrification and photoheterotrophy	15929	15928	31857
aerobic_chemoheterotrophy and nitrate_respiration	20117	11529	31646
aerobic_chemoheterotrophy and cellulolysis and methanol_oxidation	10955	20057	31012
aerobic_anoxygenic_phototrophy and anoxygenic_photoautotrophy_S_oxidizing and dark_sulfide_oxidation and methanol_oxidation and nitrogen_fixation	14321	16677	30998
aerobic_chemoheterotrophy and hydrocarbon_degradation	20227	10479	30706
aerobic_anoxygenic_phototrophy and aerobic_chemoheterotrophy and anoxygenic_photoautotrophy_H2_oxidizing and anoxygenic_photoautotrophy_S_oxidizing and dark_iron_oxidation and dark_sulfide_oxidation and iron_respiration and nitrate_reduction and nitrate_respiration and nitrogen_fixation and photoheterotrophy	16342	13088	29430
methanotrophy	14413	13925	28338